



# 세포 내 변화하는 유전자의 움직임을 실시간으로 capture Cellgraph



Cellgraph는 단일 세포의 미약한 발광을 검출하기 위해 개발된 이미지 시스템이다. 집광효율이 높은 광학계와 최고 레벨의 절대감도를 가진 냉각 CCD로 미약한 발광검출도 가능하다. 또한 incubator가 탑재되어 있어 장시간 배양이 가능하며 Firefly luciferase 처럼 발광 단백질의 유전자를 이용한 promoter의 전사활성측정을 단일 세포 레벨에서 연속 측정이 가능하다.

## ■ Cellgraph의 응용

- ▼ Reporter Assay 의 imaging 과 Timelapse (이미지를 동영상으로) 해석
  - ▷ 생체시계, Circadian Rhythm
  - ▷ 세포 약물 투여나 자극에 대한 유전자의 반응 관찰
- ▼ 세포 레벨에서 시간에 따른 모니터링
- ▼ Luciferase gene을 도입한 생물개체의 조직 절편
  - ▷ 조직 영역의 유전자발현을 측정

## ■ 고감도 CCD 카메라와 높은 집광효율의 광학계

Single Photon Count의 절대 감도를 실현한 EM 기능과 초 고감도 CCD 탑재 절대감도 1 count photon (534nm)를 실현한 고감도 냉각 CCD를 사용하였다. 절대감도는 레이저 광원을 이용하여 ATTO에서 독자적인 방식으로 개발하였다. 이 절대감도 테스트에 따르면 집점위치에서 총 발광량을 광자수로 표시 하는 것이 가능하다 (특허출원). EM (Electron Multiplying) 설정도 가능하여 보다 단시간에 촬영이 가능하다.

CCD의 noise 폭은 약 10 count (16bitAD 변환시)로 S/N=2 일 경우 검출 한계는 약 20 count/화소 이다. 보통 CCD는 노광시간이 길어지면 noise 레벨이 현저히 변화된다. 본고에 소개하는 Cellgraph는 진공밀폐 냉각방식으로 60분 정도의 노광에도 문제가 없다. 그림 1은 노광시간이 10분일 경우 Cellgraph camera noise 이다.

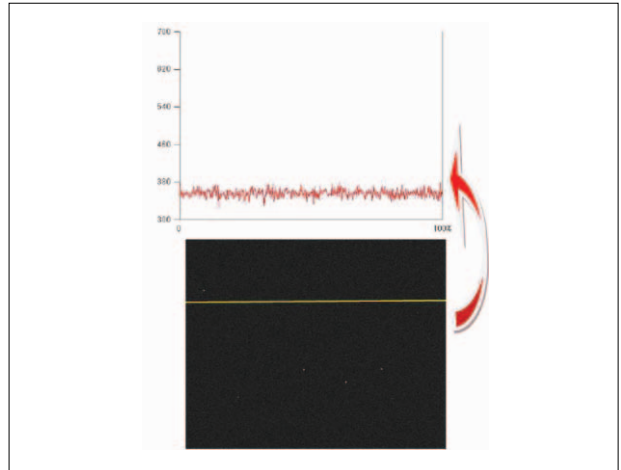


그림 1. Cellgraph로 10분 노광 시 data 화상

### • 밝은 저배율 광학계

일반적인  $\times 4$  대물렌즈의 개구수(NA)는 0.1~0.2 정도이다. Cellgraph는 광학 배율 5.6배로 NA=0.53을 실현하였다. 높은 NA는 고배율용 대물렌즈도 사용 가능하다.

### • 형광상에 따른 핀트 조정

명시야용 조명 이외에 480nm 위도조명이 부착되어 있다. GFP등을 함께 transfection 하면 target을 쉽게 확인할 수 있다.

### • 장기간 배양이 가능한 incubation 기능

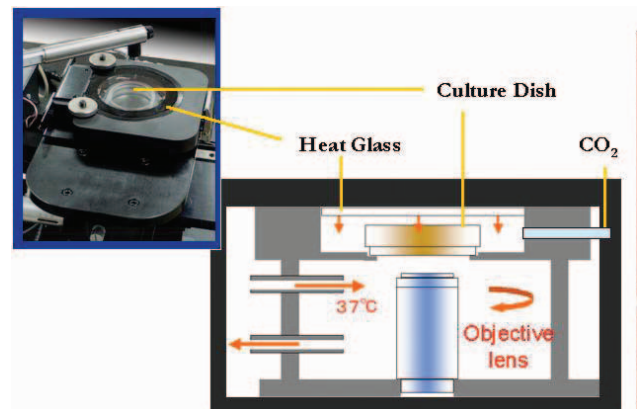


그림 2. Cellgraph의 내부 구조

■ 다양한 촬영 및 편집 기능

• 다양한 촬영 모드

설정된 시간 간격으로 촬영이 가능한 모드이다.

• Stage 제어 촬영

Target의 광도 최적한 pint 위치 선정이 어려울 경우 stage 위치(Z축)를 자동적으로 변화하면서 촬영하는 모드이다. 이 모드는 촬영한 일련의 화상으로부터 최적의 위치를 추정할 수 있다.

• Combination 촬영

발광상을 촬영한 후 명시야상의 촬영도 가능한 호환 기능이 탑재되어 있다.

• 해석 편집 기능

- Grid 계측

국소적인 발현의 차이를 구별해야 하는 경우 Stable line 처럼 세포를 각각 인식하기 어려운 경우, 임의의 영역을 분할하여 발광량을 측정하는 계측 모드이다.

- Spot 계측

세포의 발광량을 세포 개별로 계측하는 모드이다.

- Timelapse 작성

Timelapse 화상을 avi 형식으로 보존이 가능하다.

■ Clock 유전자 발현의 단일세포 imaging

Clock 유전자의 하나인 Bmal1 의 promotor에 firefly luciferase 유전자를 도입한 후 Rat1 세포에 stable cell line을 dexametasone 자극한 후 12시간 간격의 화상이다. 배율은 5.2배 노광시간은 20분이다. 모든 화상에서 화상전체의 총 발광량을 계산하여 그래프화 하면 시간에 따른 변화를 명확히 볼 수 있다.

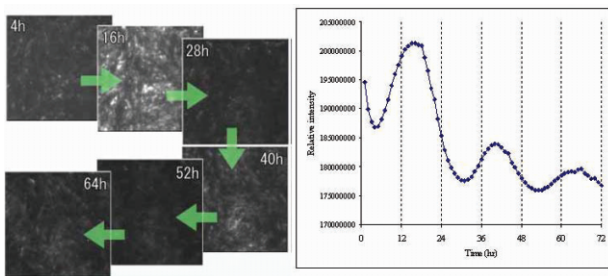


그림 3. Stable line (Bma I1 Promoter : Luciferase/rat1) (자료제공 : Y. Tanahashi (Department of Physiology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Japan))

■ Transient transfected cells의 세포간 유전자 발현 비교

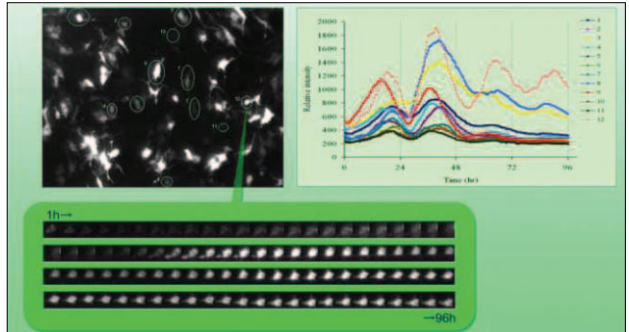


그림 4. Bma I1 Promoter 하류에 luciferase cDNA를 가진 발현 vector 2ug를 mouse 유래 NIH3T3에 도입하였다. Dexametasone처리 후 배지 교환 후 실험용 5,6배, 20분간 노광하여 촬영하였다. (자료제공 : Y. Nakajima (Cell Dynamics Research Group, Advanced Industrial Science and Technology, Japan))

■ Cellgraph 사양

제품명	AB-3000B Cellgraph	
CCD	CCD type	CCD(EM 기능첨부)
	Pixel	512×512
	Pixel size	16 μm
	AD 분해능	14/16bit
Lens	날각	-85℃(설치 환경에 의해 -70~75℃)
	광학 배율	×4
		×10
×20		
stage	X-Y-Z 축	수동
	Z축	진동 (외부제어)
시료설치부	sample holder	35mm culture dish
	항온기능	실온+5℃~45℃/0.1℃step
CO <sub>2</sub> injection	기습 unit	있음
	CO <sub>2</sub> regulator	CO <sub>2</sub> 와 공기의 혼합
light	명시야조명	백색 LED
	형광조명	청색 LED
Filter	515nm long pass filter	
	580nm long pass filter	
	620nm long pass filter	
Control program	촬영 mode	Live
		Interval
		Stage 제어
		Combination
		Background
	Filter 전환	설정된 filter의 자동제어 촬영
	exposure time	30msec~90분 정도
	조명의 외부제어	가능
	화상보존 형식	16bit TIFF
	해석 S/W	해석 대상 설정
휘도계산 해석		해석대상 화상주변의 평균 휘도
해석결과		CSV형식
화상처리		유사 color 표시
PC	OS	Windows2000, XP
	CPU	Pentium 4, CeleronD, CoreDuo
	Memory	512MB 이상
	interface	PCI card 용 slot 1
		COM port 1
		USB port 1
외관	400mm(W)×450mm(D)×700mm(H)	
중량	35 kg	